

=> file wpids  
COST IN U.S. DOLLARS

SINCE FILE	TOTAL
ENTRY	SESSION
2.43	2.43

FULL ESTIMATED COST

=> e jp 03139284/pn

E13	1	JP03139282/PN
E14	1	JP03139283/PN
E15	1 -->	JP03139284/PN
E16	1	JP03139285/PN
E17	1	JP03139286/PN
E18	1	JP03139287/PN
E19	1	JP03139288/PN
E20	1	JP03139289/PN
E21	1	JP03139290/PN
E22	1	JP03139291/PN
E23	1	JP03139292/PN
E24	1	JP03139293/PN

=> s e15

L2 1 JP03139284/PN

=> d 12 ibib abs

=> log y

FILE & COST CENTER	QUANTITY @	RATE	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
--------------------	------------	------	--------------------------------

HOME FILE COST=

CONNECT HOURS	0.09 @	15.00	1.35
WORLDCOM	0.09 @	12.00	1.08

WPIDS FILE COST=

CONNECT HOURS	0.03 @	302.00	9.06
WORLDCOM	0.03 @	12.00	0.36
DISPLAY COMPONENT 2	2 @	0.34	0.68
DISPLAY COMPONENT 3	2 @	1.50	3.00
DISPLAY COMPONENT 4	2 @	0.68	1.36
DISPLAY COMPONENT 5	2 @	0.24	0.48

SUMMARY BY FILE	AND	COST CENTER	HOURS	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
-----------------	-----	-------------	-------	--------------------------------

HOME FILE		(NONE)	0.09	2.43
WPIDS FILE		(NONE)	0.03	14.94

COSTS INCLUDE TELECOMMUNICATION FEES	0.12	1.44
--------------------------------------	------	------

SUMMARY BY	COST CENTER	HOURS	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
------------	-------------	-------	--------------------------------

(NONE)	0.12	17.37
--------	------	-------

YOUR TOTAL SESSION COSTS ARE	0.12	17.37
------------------------------	------	-------

L2 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

ACCESSION NUMBER: 1991-218448 [30] WPIDS

DOC. NO. CPI: C1991-094886

TITLE: New gene which gives macrolide antibiotic resistance  
- has DNA fragment with specified base sequence.

DERWENT CLASS: B04 D16

PATENT ASSIGNEE(S): (TOXN) TOYO JOZO KK

COUNTRY COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 03139284	A	19910613	(199130)*	13	<--
JP 2912423	B2	19990628	(199931)	13	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 03139284	A	JP 1989-178490	19890711
JP 2912423	B2	JP 1990-137997	19900528

FILING DETAILS:

PATENT NO	KIND	PATENT NO
JP 2912423	B2 Previous Publ.	JP 03139284

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1989-178490 19890711; JP 1990-137997  
19900528

AN 1991-218448 [30] WPIDS  
AB JP 03139284 A UPAB: 19930928

DNA fragment contains gene that gives at least macrolide antibiotic resistance and has base sequence 5'-CGCAGTACT-3' 5'-GGCGCCCTG-3'. Vector retains DNA fragment (1). Transformant retains vector DNA (2) that is exogenous to host.

DNA fragment (1) contains base sequence 5'-CGCAGTACT-3' between restriction enzyme sites SmaI-ScaI, and base sequence 5'-GGCGCCCTG-3' between restriction enzyme sites narI-SalI. In DNA fragment (1), base sequence between SmaI-ScaI is CCCGGGCCGGCGC GGCCGTCTGCGA CACCTGGGGCCG GTTGCCGCT GGCCGATGCCA CGGTC GCAGTACT and between NarI-SalI is GGCGCCCTGC TCGTGGTGA CACCGACCGCCG AACACCTGGTC GAGCTGGTGA CCGCTGGGGC TGCTGCGGGTCGAC. Macrolide antibiotic resistance giving gene is that gives mycinamicin resistance. Most is Actinomycetes pref. Streptomyces sp. esp. Stl lividans TK-24/pMCM4 (FERM P-10783).

USE/ADVANTAGE - By cloning macrolide antibiotic resistance gene of this invention on vector plasmid, and by insertion gene to other bacteria with the cloning vector system, the gene of this invention can be used for cloning of other gene fragment by using macrolide antibiotic resistance as a marker, selection of transformant. Further, by transformation of various kins of Actinomycetes with the gene, it can be used for screening of new antibiotic effective to macrolide antibiotic resistant bacteria, etc.

0/0

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-139284

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>C 12 N 15/65  
1/21  
15/76

識別記号

ZNA

庁内整理番号

6807-4B

④ 公開 平成3年(1991)6月13日

※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全13頁)

⑭ 発明の名称 マクロライド抗生物質耐性を付与する新規遺伝子

⑮ 特 願 平2-137997

⑯ 出 願 平2(1990)5月28日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)7月11日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 平1-178490

⑳ 発 明 者	井 上	雅 晴	静岡県田方郡大仁町三福632-1
㉑ 発 明 者	鈴 木	康 司	静岡県田方郡大仁町三福632-1
㉒ 発 明 者	諸 星	俊 郎	静岡県田方郡大仁町三福525-1
㉓ 発 明 者	武 藤	直 紀	静岡県田方郡修善寺町熊坂1077-38
㉔ 発 明 者	堀 之 内	末 治	千葉県千葉市弥生町1-170 西千葉宿舎2-406
㉕ 発 明 者	別 府	輝 彦	東京都杉並区堀之内1-5-21
㉖ 出 願 人	東洋醸造株式会社		静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

マクロライド抗生物質耐性を付与する新規遺伝子

## 2. 特許請求の範囲

(1) 少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与し、5'-CGCAGTACT-3'、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子を含むDNA断片。

(2) 5'-CGCAGTACT-3'の塩基配列を制限酵素サイトSma I-Sca Iの間に含み、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を制限酵素サイトNar I-Sal Iの間に含むことを特徴とする請求項第1項記載のDNA断片。

(3) 制限酵素サイトSma I-Sca Iの間の塩基配列が、

CCCGGGCCGGCGGGCGGCTCTGCGACACCTGGGGCCGGTTGCCGCTGCCCGATGCCACGGTCGCGTACT、および制限酵素サイトNar I-Sal Iの間の塩基配列が、GGCGCCCTGCTCGTGGTGACACCGACCGCGAACACCTGGTCGA

GCTGGTGGACCGGCTGGGGCTGCTGCGGGTCCACである請求項第2項記載のDNA断片。

(4) マクロライド抗生物質耐性を付与する遺伝子が、マイシナミシン耐性を付与する遺伝子である請求項第1項記載のDNA断片。

(5) 請求項第1項記載のDNA断片を保持することを特徴とするベクター。

(6) 宿主にとって外来性である請求項第5項記載のベクターDNAを保持することを特徴とする形質転換体。

(7) 宿主が放線菌に属する微生物である請求項第6項記載の形質転換体。

(8) 放線菌がストレプトマイセス属に属する微生物である請求項第7項記載の形質転換体。

(9) ストレプトマイセス属に属する微生物がストレプトマイセス・リビダンスに属する微生物である請求項第8項記載の形質転換体。

(10) ストレプトマイセス・リビダンスに属する微生物が、ストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*) TK-24/pMCM4「

微生物受託番号：微工研菌寄第 10783 号、FERM P-10783」である請求項第 9 項記載の形質転換体。

### 3. 発明の詳細な説明

#### <産業上の利用分野>

本発明は、少なくともマクロライド抗生物質耐性、特にマイシナミシン耐性を付与する新規な遺伝子を含む DNA 断片、該 DNA 断片を保持するベクター、および該ベクターを保持する形質転換体に関する。

<従来の技術および発明が解決しようとする問題点>

マイシナミシンはミクロモノスポラ グリゼオリビダ A11725 菌株の生産する抗生物質であり、マイシナミシンⅠ、マイシナミシンⅡ（一般名：ミボラマイシン）、マイシナミシンⅢ、マイシナミシンⅣおよびマイシナミシンⅤとして示される、16 員環の環状ラクトンおよび 2 個の糖残基からなるマクロライド抗生物質であり（"Journal of Antibiotics" Vol. 33 No. 4, p. 364-376, 1980）、

マイシナミシンについては、その生産菌の自己耐性遺伝子は未だ報告されていなかった。

#### <問題点を解決するための手段>

本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意研究したところ、マイシナミシンの生産菌であるミクロモノスポラ グリゼオリビダのゲノム DNA から、エリスロマイシン、タイロシンの自己耐性遺伝子とは全く異なる、少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与する遺伝子を含むことを特徴とする新規なマイシナミシンの自己耐性遺伝子 DNA 断片をクローニングし、該遺伝子 DNA 断片をベクターに保持せしめ、該ベクターを宿主である放線菌、例えばストレプトマイセス属に属する微生物に保持せしめて形質転換体を得、培養することにより、マイシナミシン耐性をはじめとして他のマクロライド抗生物質耐性をも発現せしめることが可能であることを見出した。

また、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子をベクタープラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベクター系を用いて

作用機構として細菌のリボソームに結合し蛋白質合成阻害をひき起こすことにより、グラム陽性の菌種をはじめ、マイコプラズマ等に強い抗菌活性を示す抗生物質である。

マクロライド抗生物質生産菌については、従来からその物質の生合成遺伝子の解明が進められている。特に、タイロシン、エリスロマイシンの 2 つの抗生物質生産菌については、それらの自己耐性遺伝子が分離されている。タイロシンについては tlrA ("International Symposium of Biology in Actinomycetes" 88 抄録 p. 365-370), tlrB (特開昭 62-294087 号公報), tlrC (特開昭 63-36788 号公報) の 3 つの独立した自己耐性遺伝子が同定されており、tlrB の近傍には生合成遺伝子群の存在が報告されている（特開昭 62-294087 号公報）。エリスロマイシンについては 1 つの自己耐性遺伝子が同定されており、その近傍に生合成遺伝子群の存在が報告されている（"Gene" 38 (1985) p. 103-110）。

しかし、同系統のマクロライド抗生物質である

他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド抗生物質耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用でき、さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用でき、そしてさらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用し合成プローブを作製することにより、マクロライド抗生物質の生産菌の DNA をハイブリダイゼーション法により同定することを可能にする等、既知物質の収量の増大、ならびに新規抗生物質および抗生物質誘導体の開発を目的とする多くの有用な用途があることを見出した。

即ち本発明は、少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与し、5'-CGCAGTACT-3'、5'-GGCGCCC TG-3' の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子を含む DNA 断片、

該 DNA 断片を保持することを特徴とするベク

ター、

宿主にとって外来性である核ベクターDNAを保持することを特徴とする形質転換体、を提供する。

本発明のDNAは、例えば遺伝子組換え技術を利用して次の如くして製造される。

例示すれば、マイシナミシン産生能を有し、マイシナミシン耐性遺伝子の供与体である微生物より該微生物のゲノムDNAを分離精製した後、ショットガン法で制限酵素等により部分消化した該DNAと、切断してリニヤーにした発現ベクターとを両DNAの平滑または接着末端部においてDNAリガーゼ等により結合開環させる。次いで得られた組換えDNAベクターのマーカーおよび/またはマイシナミシン耐性を指標としてスクリーニングして取得した該組換えDNAベクターを保持する微生物を培養し、該培養菌体から該組換えDNAベクターを分離精製し、ついで該組換えDNAベクターからマイシナミシン耐性を付与する本発明DNAを採取することにより製造できる。

レアーゼ処理、アルコール沈殿、遠心分離等の方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

分離精製された微生物DNAを切断する方法は、例えば、超音波処理、制限酵素処理等により行うことができるが、得られるDNA断片とベクターとの結合を容易ならしめるため、ショットガン法により、例えば、BamHI, Nco I, Pst I, Sph I等の制限酵素で部分消化すればよく、好ましくはBamHIまたはPst Iで行うのが適している。

ベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。

ファージとしては、例えば、ストレプトマイセス・リビダンスを宿主微生物とする場合には、 $\phi$ C31等が使用でき、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C,  $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ B等が使用できる。

また、プラスミドとしては、例えば、ストレプトマイセス・リビダンスを宿主微生物とする場合

DNAの供与微生物は、マイシナミシン産生能を有し、マイシナミシン耐性遺伝子を供与する微生物であればよく、好ましくはミクロモンスポラ属に属するミクロモンスポラ グリゼオルビダ A 11725 (FERM BP-705) が挙げられる。

遺伝子の供与体である微生物に由来するDNAは次のようにして採取される。例えば、液体培地で約1〜3日間通気攪拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによってマイシナミシン耐性遺伝子を含有する溶菌物を調整する。溶菌方法としては、例えばリゾチームやアクロモベプチダーゼ等の細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要によりプロテアーゼ等の他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム等の界面活性剤が併用され、さらに細胞壁の物理的破壊法である凍結融解やフレンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行ってもよい。このようにして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには、常法に従って、例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボヌク

にはpIJ41, pIJ922, pIJ702, pIJ680, pIJ364等が使用でき、好ましくはpIJ41, pIJ702である。またエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pUC118, pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19等が使用でき、好ましくはpUC118である。さらに、ストレプトマイセス・リビダンスおよびエシェリヒア・コリ等の2種以上の宿主微生物の細胞中で自律的に増殖可能なシャトルベクターを利用することもできる。このようなベクターを、先に述べたマイシナミシン耐性遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが好ましい。

微生物DNA断片とベクター断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば、微生物DNA断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの作用により微生物DNAとベクター断片との組換えDNAを作製する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に

移入して、生体内のDNAリガーゼを利用し組換えDNAを作成することもできる。

宿主微生物としては、組換えDNAが安定かつ自律的に増殖可能で、かつ外来性のDNAの形質が発現できるものであればよく、例えば、宿主微生物が放線菌に属するストレプトマイセス・リビダンスの場合、ストレプトマイセス・リビダンスTK-24、ストレプトマイセス・リビダンスTK-23、ストレプトマイセス・リビダンス1326、ストレプトマイセス・リビダンスTK-21（以上、英国ジョン・イネス研究所より入手可能である）等が使用でき、特にストレプトマイセス・リビダンスTK-24を用いるのが好ましい。また宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合、エシェリヒア・コリMV1304、エシェリヒア・コリDH1、エシェリヒア・コリRB101、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600等が使用でき、特にエシェリヒア・コリMV1304を用いるのが好ましい。

宿主微生物に組換えDNAを移入する方法としては、例えば、宿主微生物がストレプトマイセス

属に属する微生物の場合には、ポリエチレンジリコールの存在下で移入を行い、またエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行えばよい。

宿主微生物への目的組換えDNA移入の有無についての選択は、目的DNA断片を保持する組換えDNAであるベクターのマーカー、好ましくは薬剤耐性マーカーおよび／またはマイシナミシン耐性を発現し得る微生物を検索すればよく、例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育すればよい。

このようにして一度選択されたマイシナミシン耐性遺伝子を保有する組換えDNAは、形質転換微生物から取り出され、他の宿主微生物に移入することもできる。また、マイシナミシン耐性遺伝子を保持する組換えDNAから制限酵素等により切断してマイシナミシン耐性遺伝子であるDNAを切り出し、これと同様な方法により切断して得られる他の閉環ベクター末端とを結合させて、新規な特徴を有する組換えDNAを作成して、他の

宿主微生物に移入することもできる。

斯くして得られる形質転換体を具体的に例示すれば、ミクロモノスポラグリゼオルビダA11725（FERM BP-705）より採取したマイシナミシン耐性をコードする遺伝子を含むDNAをプラスミドpIJ41に組み込み、該プラスミドpHCM4を宿主微生物に移入して得た形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスTK-24/pHCM4株「微工研菌寄第10783号（FERM P-10783）」が挙げられる。

かくして得られる本発明DNAの塩基配列は、Science 214 1205~1210（1981年）に示されているジデオキシ法で解読し決定することができる。

例えば、マイシナミシン耐性遺伝子供与体としてミクロモノスポラグリゼオルビダに属する菌を用い、宿主微生物としてエシェリヒア・コリを用いて得られたプラスミド中の遺伝子の塩基配列としては、少なくとも5'-CGCAGTACT-3'、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を含むことを特徴としており、また5'-CGCAGTACT-3'の塩基配列を制限酵素

サイトSma I-Sca Iの間に含み、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を制限酵素サイトNar I-Sal Iの間に含む特徴を有している。

さらに付加的に特徴を挙げるに当たり、制限酵素サイトSma I-Sca Iの間の塩基配列および制限酵素サイトNar I-Sal Iの間の塩基配列はそれぞれ次の通りである。

(Sma I-Sca I)

CCCGGGCCGCGCGCGCGCTCTGCGACACCTGGGGCCGGTTGCCGCTGCCCGATGCCACGGTCGCAGTACT

(Nar I-Sal I)

GGCGCCCTGCTCGTGGTGACACCGACCGCCGAACACCTGGTCCAGCTGGTGACCGGCTGGGGCTGCTGCGGGTCGAC

また、第3-i図および第3-ii図にて示される本発明の制限酵素サイトNco I-Sph I間のDNA断片の塩基配列を基に、例えば第1図の制限酵素地図にて示される適宜な制限酵素を1種または2種以上用いて水性媒体、好ましくは緩衝液中で加水分解せしめる等の周知の技術によってその小断片塩基配列を得ることができる。このように

して得られる本発明の少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与する DNA の特徴部分を有する小断片塩基配列は、10〜数10の塩基数またはそれ以上のものがよく、さらにその相補配列のものでよく、これらの小断片は、同一または類似の DNA のプローブとして利用できる有用性を有するものである。

次いで形質転換体である微生物の培養形態はその栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すれば良く、通常多くの場合は、液体培養で行うか、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、還元可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、サッカロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜等が使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であれば良く、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物等が使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム

、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛等の塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミン等が必要に応じて使用される。

培養温度は微生物が発育し、マイシナミシン耐性を発現し得る範囲で適宜変更し得るが、ストレプトマイセス・リビダンスの場合、好ましくは28〜30℃程度である。培養時間は、条件によって多少異なるが、マイシナミシン耐性の発現が現れる時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、通常48〜72時間程度である。培地 pH は菌が発育し、マイシナミシン耐性を発現し得る範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくは pH 7.0〜7.5 程度である。

かくして得られる形質転換体の培養物中からマイシナミシン耐性を付与する遺伝子をもつプラスミド pMCM4 を分離・精製し、このプラスミド pMCM4 を用いて種々の目的に使用することができる。例えば、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を含む DNA 断片をベクタープラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベ

クター系を用いて他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド抗生物質耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用できる。さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用できる。またさらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用し合成プローブを作製することにより、マクロライド抗生物質の生産菌の DNA をハイブリダイゼーション法により同定することも可能である。

#### <実施例>

以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

(マイクロモンスポラ グリゼオルビダ A11725 由来ゲノム DNA の調製)

マイクロモンスポラ グリゼオルビダ A11725 (FERM BP-705) の凍結乾燥菌を150ml の三角コルベンを用いてシード培地30ml (可溶性デンプン2g, イーストエキストラクト0.5g, N.2アミン0.5g, トリプトケース0.5g, 炭酸カルシウム0.1g, 硫酸第一鉄2 mg, 10N NaOH 20  $\mu$  l, 水100 ml, pH: 7.2) で28℃にて48時間培養した。

その後、本培養物を種母とし、500ml の三角コルベンを用いて100ml の培養液 (可溶性デンプン2.5g, ポリペプトン0.8g, イーストエキストラクト0.2g, カザミノ酸0.1g, 硫酸第一鉄2 mg, 硫酸マグネシウム50mg, 水90ml, 1/10M pH7.0リン酸緩衝液10ml) に接種菌体量5%になるように接種し、96時間培養した。

培養菌体を、4℃・6,500rpmにて20分間遠心分離し、沈査を0.3Mサッカロース50mlにて洗浄した。その後、再び4℃・6,500rpmにて20分間遠心分離し、TES緩衝液 (50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液 (シグマ社製), 35mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25%サッカ

ロス) 20ml に懸濁し、最終濃度が各々リゾチーム 2 mg/ml、アクロモベプチダーゼ (和光純薬社製) 1 mg/ml になるように添加して、37℃ にて 3 時間反応させた。その後、10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) を 0.5ml 添加後、37℃ にて 5 分間放置し、クロロホルム-フェノール 2ml を加えて攪拌した。この溶液を、20℃・10,000rpm にて 3 分間遠心分離し、上層を 100ml のビーカーにとり、エタノール 42ml を静かに流し入れた。更にこの液を、滅菌した細いガラス棒でかきまぜながらクロモゾーム DNA を巻き取り、標品であるミクロモノスポラ グリゼオルビダ A11725 のゲノム DNA を得た。

#### 実施例 2

(プラスミド pIJ41 の単離)

(1). ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pIJ41 の培養

ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pIJ41 胞子約  $10^8$  個を、チオストレプトン  $2 \mu\text{g/ml}$  を含有する TSB (トリプトケースソイブロー、

ホルム 500ml の混合液) を加えてよく混合した。6,500rpm・室温にて 30 分間遠心分離後、上清約 45ml を滅菌したビンに移した。次いで冷エタノール 90ml を加えて、 $-110^\circ\text{C}$  にて 20 分間放置し、 $4^\circ\text{C}$ ・6,500rpm にて 30 分間遠心分離を行った。沈査へ 7ml の TE (10mM トリス塩酸緩衝液, 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) を加え、更に  $2 \text{ mg/ml}$  の RNase A (シグマ社製) 溶液を添加して、37℃ にて 20 分間インキュベートした。次いで 8ml の TE-フェノール液を加え、充分に混合後、10,000rpm・室温にて 10 分間遠心分離を行った。上層をパスツールピペットでとり、16ml の冷エタノールを加え、 $-110^\circ\text{C}$  にて 20 分間放置後、10,000rpm・ $4^\circ\text{C}$  にて 10 分間遠心分離し、沈査を滅菌乾燥させ、TE 19ml を加え DNA を溶かした。そこへ塩化セシウム 20g、臭化エチジウム  $10 \text{ mg/ml}$  の溶液 2ml を加えて攪拌した。この溶液を超遠心チューブに移し、 $20^\circ\text{C}$ ・50,000rpm にて 16 時間遠心分離した。その後、プラスミドバンドが含まれている画分を紫外線照射しながら無菌化された注射

Difco 社製) 10ml に接種し、培養が初期定常期に達するまで  $28^\circ\text{C}$  で増殖させた。次いでこの 5ml を使用してチオストレプトン  $2 \mu\text{g/ml}$  を含有する TSB 培地 100ml へ接種し、48 時間培養を行った。

#### (2). プラスミドの単離

上記の培養菌体を集め、0.3M サッカロース溶液で 1 回洗浄した。次いでリゾチーム溶液 (50mM トリス塩酸緩衝液, 35mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 25% サッカロース, リゾチーム 最終濃度  $1 \text{ mg/ml}$ ) 30ml を添加した。この溶液を  $30^\circ\text{C}$  で 60 分間インキュベートし、次いで 10N NaOH  $500 \mu\text{l}$ , 10% SDS  $2.5 \text{ ml}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$   $9.5 \text{ ml}$  からなる溶液 12ml を加え混合した。これを  $0^\circ\text{C}$  にて 10 分間放置後、5M 酢酸カリウム緩衝液 (5M 酢酸カリウム 20ml, 酢酸 3.8ml,  $\text{H}_2\text{O}$  9.5ml) を加えて混合した。再び  $0^\circ\text{C}$  にて 10 分間放置後、 $4^\circ\text{C}$ ・30,000rpm にて 40 分間超遠心分離を行った。上清を集め、等量のクロロホルム-フェノール液 (10mM トリス塩酸緩衝液および pH8.0N  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1mM で飽和したフェノール 500ml とクロロ

ホルム 500ml の混合液) を加えてよく混合した。6,500rpm・室温にて 30 分間遠心分離後、上清約 45ml を滅菌したビンに移した。次いで冷エタノール 90ml を加えて、 $-110^\circ\text{C}$  にて 20 分間放置し、 $4^\circ\text{C}$ ・6,500rpm にて 30 分間遠心分離を行った。沈査へ 7ml の TE (10mM トリス塩酸緩衝液, 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) を加え、更に  $2 \text{ mg/ml}$  の RNase A (シグマ社製) 溶液を添加して、37℃ にて 20 分間インキュベートした。次いで 8ml の TE-フェノール液を加え、充分に混合後、10,000rpm・室温にて 10 分間遠心分離を行った。上層をパスツールピペットでとり、16ml の冷エタノールを加え、 $-110^\circ\text{C}$  にて 20 分間放置後、10,000rpm・ $4^\circ\text{C}$  にて 10 分間遠心分離し、沈査を滅菌乾燥させ、TE 19ml を加え DNA を溶かした。そこへ塩化セシウム 20g、臭化エチジウム  $10 \text{ mg/ml}$  の溶液 2ml を加えて攪拌した。この溶液を超遠心チューブに移し、 $20^\circ\text{C}$ ・50,000rpm にて 16 時間遠心分離した。その後、プラスミドバンドが含まれている画分を紫外線照射しながら無菌化された注射

#### 実施例 3

(プラスミド pMCM4 の組み立て)

実施例 1 で得られたミクロモノスポラ グリゼオルビダのゲノム DNA 約  $5 \mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (10mM pH8.0 トリス塩酸緩衝液, 7mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM NaCl, 2mM メルカプトエタノール, 0.01% ウシ血清アルブミン) で部分消化した。この消化した遺伝子を以下の方法にてプラスミド pIJ41 の BamHI サイトへクローニングを行った。

まず、プラスミド pIJ41 を 10mM トリス塩酸緩衝液, 7mM pH8.0 塩化マグネシウム, 100mM 塩化ナトリウム, 2mM 2-メルカプトエタノール, 0.01% ウシ血清アルブミンを含む反応液にて制限酵素 BamHI



I で完全消化した後、バクテリアアルカリフォスファターゼ（東洋紡績社製）を0.5 単位加え、65℃にて1時間反応させた。その後、クロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離してプラスミド断片を回収した。次に、上記のBamHIで部分消化したマイクロモノスポラグリゼオルヒグDNA断片（4～15Kbp）を、上記のプラスミドpIJ41のBamHIサイトにライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。以上の操作で得られた組換え体プラスミドをストレプトマイセス・リビダンス TK-24に導入し形質転換した。

胞子が着生するまで再生させた後、マイシナミシン II 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及びチオストレプトン 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含むトリプトケースソイアガー（TSA, Difco 社製）培地にレプリカし、マイシナミシン耐性株を得た。この耐性株よりプラスミドを調製したところ、すべてのプラスミドはBamHIで切り出される約5KbpのDNA断片が含まれており、これら

のプラスミドは再形質転換によりストレプトマイセス・リビダンス TK-24にマイシナミシン耐性を付与した。

こうして得られた約5KbpのDNA断片をBamHI・SphIで完全消化することによりサブクロニングを行い、得られた約2.8KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収した（「ラボニアール遺伝子工学」村松正実編（丸善発行）P.20-28）。得られた約2.8Kbpの制限酵素BamHI-SphI間のDNA断片の制限酵素地図を第1図に示した。

一方、プラスミドpIJ41をBamHI・SphIで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフォスファターゼ（東洋紡績社製）を0.5 単位加え、65℃にて1時間反応させた。その後クロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離して、プラスミドを回収した。

次いで、上記低融点アガロースゲルから回収し

た約2.8Kbpの挿入断片と、上記BamHI・SphIで完全消化したプラスミドpIJ41を、ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。こうして得られた組換え体プラスミドをプラスミドpMCH4と命名し、このプラスミドpMCH4の制限酵素地図を第2図に示した。

#### 実施例4

〔ストレプトマイセス・リビダンス TK-24への形質転換〕

ストレプトマイセス・リビダンス TK-24をトリプトソイブロス（TSB, Difco 社製）10mlに胞子約 $10^8$ 個を加えて初期定常期に達するまで28℃で増殖させた。次いでこの5mlを使用し、TSB培地100mlへ接種し、48時間培養を行った。その後、4℃・6,500rpmにて20分間の冷却遠心分離後、沈査を0.3Mサッカロース50mlで洗浄し、リゾチームが1mg/mlになるように高張リン酸緩衝液（25mMトリスメチル2-アミノエタンスルホン酸、25mM CaCl<sub>2</sub>、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、サッカロース 103g、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25g、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 2.02g、\*Tr

ace Element Solution 2ml、H<sub>2</sub>O 800ml）4mlに懸濁し、30℃にて100分反応させた。

\* Trace Element Solutionの組成

ZnCl <sub>2</sub>	40mg
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	200mg
CuCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	10mg
MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	10mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ・10H <sub>2</sub> O	10mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ・4H <sub>2</sub> O	10mg

その後、この菌懸濁液を滅菌したガラスウールで濾過し、ガラスウール通過液を1,300rpmにて5分間遠心分離した。その上清を再びガラスウールで濾過した後、2,800rpmにて10分間の遠心分離を行い、その沈査からプロトプラスト細胞を得た。この沈査を上記の高張リン酸緩衝液500  $\mu\text{l}$ に懸濁し、 $2.4 \times 10^8$  cells/mlのプロトプラスト溶液を得た。

このプロトプラスト溶液を50  $\mu\text{l}$ 分取し、実施例3で得たプラスミドpMCH4 10  $\mu\text{l}$ と混合させ、滅菌した25%ポリエチレングリコール液（

分子量1,000 ) 500  $\mu$ l を加えて室温に2分間放置した。さらに2分後、高張リン酸緩衝液500  $\mu$ l を加えて混合し、これを希釈し、再生培地であるMR0.3 S培地(2%可溶性デンプン、0.75%ミート、0.5%ポリペプトン、0.1%炭酸カルシウム、硫酸第一鉄4mg、0.5%塩化マグネシウム、10.3%サッカロース、\* Trace Element Solution 1ml、寒天2.2g、pH: 7.2)に0.6%寒天を含むリン酸緩衝液(P-ソフト寒天)とともに重層した。

24時間後にチオストレプトン(最終濃度2  $\mu$ g/ml)、マイシナミシンII(最終濃度100  $\mu$ g/ml)を含むP-ソフト寒天を再び重層し、30℃にて5日間培養した。得られた形質転換体をチオストレプトン2  $\mu$ g/ml、マイシナミシンII 100  $\mu$ g/mlを含むTSB培地5mlで、28℃にて2日間培養し、この培養液1mlを遠心分離により集菌した。このようにして得た形質転換体をストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*) TK-24/pMCM4[微工研菌寄10783号(FERM P-10783)]として工業技術

#### の薬剤耐性付与の実験]

実施例3で得られたプラスミドpMCM4を用いて、制限酵素EcoRIで37℃にて1時間完全消化した後、65℃にて30分間処理した。その後、T4 DNAポリメラーゼにより突出末端をうめて平滑末端とし、その後制限酵素NcoIで37℃にて1時間完全消化した。これをクロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容エタノールを加えて遠心分離後、約0.9KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収して得た。一方、プラスミドpIJ702をEcoRV, NcoIで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフォスファターゼ(東洋紡績社製)を0.5単位加え、65℃にて1時間反応させ、その後クロロホルム-フェノール処理を2回行い、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加えて遠心分離し、EcoRV, NcoIで完全消化したプラスミドpIJ702を回収した。

次に、上記低融点アガロースゲルから回収して

院微生物工業技術研究所に寄託した。

次いで、上記の集菌した沈査に2mg/mlリゾチームを含む50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液、35mM pH8.0 Na<sub>2</sub>EDTA、25%サッカロース0.2mlを加え、37℃で60分間反応させた後、25%SDSを含む0.4M NaOH 100  $\mu$ lを加え混合した。次いでこれを0℃にて5分間放置した後、酢酸カリウム液(5M酢酸カリウム600  $\mu$ l、酢酸115  $\mu$ l、水285  $\mu$ l)150  $\mu$ lを加え、0℃にて5分間放置した。その後、15,000rpmにて5分間遠心分離した後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層をエーテルで2回処理してから2倍容のエタノールを加え、-70℃で20分間放置した。その後、15,000rpmにて15分間遠心分離して、沈査を回収し、75%エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、沈査を5  $\mu$ g/ml RNase Aを含む水に溶き、BamHI-SphIで完全消化して挿入断片を含むクローンを選別した。

#### 実施例5

(制限酵素サイトNcoI-EcoRIサイト間塩基

得た約0.9Kbp DNA断片と、上記EcoRV, NcoIで完全消化したpIJ702をライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させた。こうして得られた組換えプラスミドをストレプトマイセス・リビダンス TK-24に形質転換させ、この形質転換体のマクロライド抗生物質に対する薬剤耐性を調べた結果、薬剤耐性値は宿主であるストレプトマイセス・リビダンス TK-24と変わらず、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

同様にして制限酵素サイトSau 3A I-EcoRI間塩基の薬剤耐性付与の実験をした結果、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

#### 実施例6

(制限酵素サイトEcoRI-SphI間塩基の薬剤耐性付与の実験]

実施例5と同様にして、実施例3で得られたプラスミドpMCM4を用いて、制限酵素EcoRIで37℃にて1時間完全消化した後、65℃にて30分間処理した。その後、T4 DNAポリメラーゼにより突出末端をうめて平滑末端とし、その後制限酵

素Sph I で37℃にて1時間完全消化した。これをクロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10容3M酢酸ナトリウムおよび2倍容エタノールを加えて遠心分離後、約1.0KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収して得た。一方、プラスミドpIJ702をEcoRV, Sph I で完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフォスファターゼ（東洋紡績社製）を0.5単位加え、65℃にて1時間反応させ、その後クロロホルム-フェノール処理を2回行い、水層に1/10容3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加えて遠心分離し、EcoRV, Sph I で完全消化したプラスミドpIJ702を回収した。

次に、上記低融点アガロースゲルから回収して得た約1.0KbpのDNA断片と、上記EcoRV, Sph I で完全消化したpIJ702をライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。こうして得られた組換体プラスミドをストレプトマイセス・リビダンス TK-24に形質転換させ、この形質転換体のマクロライド抗生物質に対する薬剤耐性を調

べた結果、薬剤耐性は宿主であるストレプトマイセス・リビダンス TK-24と変わらず、耐性発現は起こっていなかった。

同様にして制限酵素サイトEcoRI-Pvu II間塩基の薬剤耐性付与の実験をした結果、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

#### 実施例7

##### 〔塩基配列の決定〕

(1). プラスミドpUC118への組換え、およびエシェリヒア・コリへの形質転換

実施例3で得られた約2.8KbpのBamHI-Sph I制限断片を以下の通りベクターpUC118のBamHI-Sph I部位にクローニングし、エシェリヒア・コリMV1304に形質転換した。

まず、pIJ41をBamHI, Sph Iで完全消化して得られた約2.8Kbpの挿入断片を低融点アガロースから回収した。また、プラスミドpUC118をBamHI, Sph Iで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフォスファターゼ0.5単位を加え、65℃にて1時間反応させ

た。クロロホルム-フェノール液で2回処理した後、水層に1/10容3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離してプラスミドを回収した。

上記ゲルから回収した挿入断片と上記BamHI, Sph Iで消化したプラスミドpUC118をライゲーションキットを用いて連結させた。100mlのLB培地（1ℓにつき、バクトリアプトン20g、バクティーストエキストラクト5g, MgSO<sub>4</sub>, pH: 7.6）で培養した対数増殖期のエシェリヒア・コリMV1304を集菌し、40mlの氷冷緩衝液（30mM酢酸カリウム, 100mM RbCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 15%グリセリン, pH: 5.8）で懸濁し、0℃にて5分間放置した後遠心集菌し、さらに4mlの10mM OPS緩衝液（ドータイト社製）（5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM RbCl, 15%グリセリン, pH: 6.5）に懸濁し、0℃で15分間放置して、コンピテント細胞とした。このエシェリヒア・コリ懸濁液200μℓにライゲーションしたDNA溶液20μℓを加え、0℃にて30分間放置した。その後、42℃にて9

0秒間熱処理し、LB培地800μℓを加え、31℃にて90分間インキュベートした。この内の300μℓをアンピシリン50μg/ml, 0.02% X-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド）および50μM IPTG（イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド）を含むLB培地寒天プレートにまき、一晚培養して形質転換体を得た。

形質転換した単一の白いコロニーを2mlのLB培地で一晚培養し、遠心分離により集菌した。これに1mg/mlリゾチームを含む50mM pH8.0トリス-塩酸, 50mM pH8.0 Na<sub>2</sub>EDTA, 15% サッカロースからなる液0.6mlを加え、37℃にて15分間反応させた後、10%SDS 12μℓを加え混ぜ合わせた後、5M酢酸カリウム60μℓを加え、0℃で30分間放置した。その後、10,000rpmにて15分間遠心分離後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層をエーテル処理し、2倍容のエタノールを加え、-70℃にて15分間放置した。その後、15,000rpmにて15分間遠心分離して沈査を回収し、75%エタノールで2回洗浄後、

減圧乾燥した。沈査を5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase Aを含む水に溶き、BamHI, Sph Iで消化し、挿入断片を含むクローンを選別した。

## (2). 塩基配列の決定

こうして得られたクローンを含む単一コロニーを6mlのLB培地に於て37℃で一晩培養後、その内の5mlを500mlのLB培地に植菌し、37℃で培養した。対数増殖期の菌液に150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを加え、さらに一晩培養した。6,000rpmにて10分間の遠心分離により集菌し、10% サッカロース20ml, 25mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50mM pH8.0 トリス塩酸にリゾチームを最終濃度20mg/mlとなるように加え、37℃にて10分間反応後、10% SDS 2mlを加え、37℃にて2分間処理した。14,000rpmにて30分間遠心分離後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層に1/10容の3M酢酸ナトリウムと2倍容のエタノールを加えて、-70℃にて15分間放置した。3,000rpmにて15分間遠心分離後、回収した沈査に21mlのトリス塩酸 (pH7.4) を加えて溶解し、塩化

セシウム20g および臭化エチジウム1mlを加え、4℃・50,000rpmにて一晩遠心分離した。その後、閉環状プラスミドDNAを分取し、臭化エチジウムを除くためイソプロパノールで5回抽出した。その後、透析により塩化セシウムを除き、2倍容のエタノールを加えて、-70℃にて15分間放置した。3,000rpmにて30分間遠心分離し、沈査を75% エタノールで2回洗浄後、減圧乾燥し、濃度を約1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように調製した。

得られたプラスミドから、約2.2Kbpである制限酵素サイトNco I-Sph Iの間の領域にわたり正負両鎖の一本鎖DNAを調製し、M13を用いたジデオキシ法 (Science, 214, 1205-1210 (1981)) を用いて塩基配列を解析し、第3-i図および第3-ii図の通り決定した。その結果、本発明の遺伝子DNAは少なくとも制限酵素EcoRIサイトGAATTCを中流域に有し、その上流域に少なくとも5'-CGCAGTACT-3'の塩基配列を含み、下流域に5'-GCCGCCCTG-3'の塩基配列を含むことを特徴としており、5'-CGCAGTACT-3'の塩基配列を制限酵素サ

イトSma I-Sca Iの間に含み、5'-GCCGCCCTG-3'の塩基配列を制限酵素サイトNar I-Sal Iの間に含む特徴を有していた。

また、制限酵素サイトSma I-Sca Iの間の塩基配列および制限酵素サイトNar I-Sal Iの間の塩基配列の特徴はそれぞれ次の通りであった。

{Sma I-Sca I}

CCCGGGCCGGCGGGCGGCTCTGCGACACCTGGGGCCGGTTGCCG  
CTGGCCGATGCCACGGTCCGAGTACT

{Nar I-Sal I}

GGCGCCCTGCTCGTGGTGACACCGACCGCCGAACACCTGGTCGA  
GCTGGTGGACCGGCTGGGCTGCTCGGGTTCGAC

尚、本発明の遺伝子DNAのオープンリーディングフレームは第4図の通りであった。

## 実施例 7

(ミクロモノスポラ グリゼオルビダ A11725、ストレプトマイセス・リビダンス TK-24、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMCM4の各薬剤耐性度検査)

供与微生物であるミクロモノスポラ グリゼオ

ルビダ A11725、宿主細胞であるストレプトマイセス・リビダンスTK-24 および実施例4で得られた形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMCM4の各種マクロライド剤に対する薬剤耐性度を検討した。

トリブトケースソイアガー (TSA, Difco 社製) を20mlシャーレに入れ、マクロライド抗生物質であるマイシナミシンII (マイシナミシンの一成分)、ジョサマイシン、エリスロマイシン、チオストレプトンを10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度を変え、培地を作製した。

このシャーレにミクロモノスポラ グリゼオルビダ A11725、ストレプトマイセス・リビダンス TK-24および-70℃凍結保存菌であるストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMCM4を白金耳塗布し、28℃にて48時間培養を行い、菌の増殖が抑制された最小の濃度をそれぞれ耐性度とし、第1表に示した。

(以下 余白)

第 1 表  $(\mu\text{g}/\text{ml})$

Drug Strain	マイナミシン II	グロチマイシン	エリスロマイシン
マイクロノズチ グリセロール ヒド A11725	50	20	2
ストレプトマイセス・リビダン ス TK-24	250	20	2
ストレプトマイセス・リビダン ス TK-24/pMCM4	≥ 500	200	30

**<発明の効果>**

本発明のマクロライド抗生物質耐性遺伝子は、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子をベクタープラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベクター系を用いて他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用でき、さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用でき、そしてさらにこのマクロライ

ド抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用し合  
 成プローブを作製することにより、マクロライド  
 抗生物質の生産菌の DNA をハイブリダイゼーシ  
 ョン法により同定することを可能にする等、既知  
 物質の収量の増大、ならびに新規抗生物質および  
 抗生物質誘導体の開発を目的とする多くの有用な  
 用途を提供する。

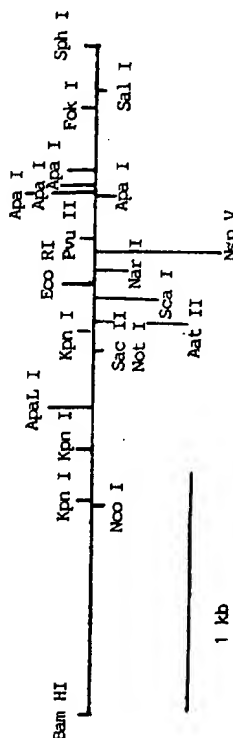
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、制限酵素BamH I-Sph I間のDNA断片の制限酵素地図を示す。第2図は、プラスミドpMCM4の理化学的性質を示す。第3-i図および第3-ii図は、制限酵素Nco I-Sph I間の塩基配列を示す。第4図は、オープンリーディングフレームを示す。

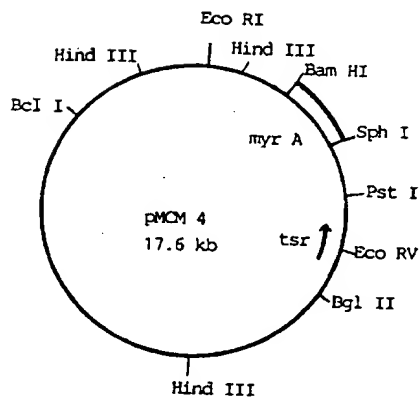
特許出願人

・ 東洋醸造株式会社

第 1 图



第 2 图



第 3-i 図

10	20	30	40	50	60
CCATGGTGTG	AACCGGGTAC	CGCCGGGGAC	GAAAGCAGCC	GTGCGGTGCA	CGGGGTGCGT
70	80	90	100	110	120
GATCCAGACC	GGCGCCGGCC	CGCCGAGCGC	AGCCAGCAGC	GCCGGGTGCG	GGGCGACCGC
130	140	150	160	170	180
CTCCTCGCCG	ACGGCGGTGG	AGCCGGGGAG	CAGCCGAACC	AGGTCTCTCG	TGAGTAGCTG
190	200	210	220	230	240
CTCGGTGAGC	GTGTCCGGCA	CGGTACCCAG	GTGCGCGGGG	GCCTTCTCCG	CGACGCTGGC
250	260	270	280	290	300
CTGCTCCAGC	CGGCGGTACC	GGGTATCATC	CACCTCGTCG	ACGATCCGCC	TGACCAACTG
310	320	330	340	350	360
ACCCACTGCG	GTGAACCGGG	CGAGATCCAG	CATCGTCCGA	TGTTAGGGGT	CGGCTCCGCG
370	380	390	400	410	420
TCCGGCTGAC	CGCGCGAGCG	TCGCGGGCGG	ATGCCCTAGG	CTGACCGGGT	GCACCCCGAC
430	440	450	460	470	480
CTGTCTCCCC	ACCTCCGCTG	CCCGGTCTGC	GGCCAGCCGC	TGCACAGGC	CGACGCGGCA
490	500	510	520	530	540
CCACCACGCG	CCCTCGGCTG	CCCGCGCGGG	CACAGCTTCG	ACATCGCCCG	ACAGGGTTAC
550	560	570	580	590	600
GTCAACCTGC	TCACGGGGCG	GGCACCGCAC	GTCCGGCGACA	CGCGCGAGAT	GATCGCCGCC
610	620	630	640	650	660
AGGGAGGAGT	TTCTGGCCGC	CGGGCACTAC	GACCCGTTCT	CGGCGGCAC	CGCCACCCCG
670	680	690	700	710	720
GCCGCGCGGG	CGGTGCCACG	TCGTGTCCGG	CCCGGGCGAC	GCGTGGGGCG	ACCGGTGGCG
730	740	750	760	770	780
TACCCGGATC	TGGTGGTGGG	CGCCGGAGCC	GGTACCGGCC	GGCACCTCCG	CGCAGTGCTC
790	800	810	820	830	840
GACCGGCTGC	CGACCGCCGT	CGGCCTGGCG	CTGGACCTCT	CGAAGCCCGC	ACTACCCCGG
850	860	870	880	890	900
GCGGCGCGGG	CGCATCCCGG	GGCGGGCGCG	GCCGTCTGCG	ACACCTGGGG	CCGGTTGCGG
910	920	930	940	950	960
CTGGCCGATG	CCACGGTCCG	AGTACTGTCT	AACGTCTTCG	CCCCCGCGAA	CGGGCCGGAA

第 3-ii 図

970	980	990	1000	1010	1020
TTCCGTGCGG	TGCTCCGGCC	GGACGGGGCC	CTGCTCGTGG	TGACACCGAC	CGCCGAACAC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CTGGTCCAGC	TGGTGGACCG	GCTGGGGCTG	CTGCGGGTGG	ACCCGGCCAA	GGACGGCCGG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GTGGCCGACA	GCCTCAGGAG	ACACTTCGAA	CCGGCCGGGG	AGAGCACCCA	CCGGCACCCG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CTTCAGCTGA	CCCGGAAGGA	GGTGTGTACC	CTGGTTGGTA	TGGGGCCGAG	CGCCTGGGAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ACCGACCCGG	CCCGGCTCAC	CGCGGGGGT	GCAGCCCTGT	CCGAGCCGGT	CACGGTCACC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GCCGCTGTCC	GGCTCGCCCG	TTACCGGGCC	ATCTGACCCG	CCGGCCCGCC	ACCCGGGGCC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CCCGGGTCCG	CGGGCCCGGT	TCGGCGGGCC	CGGCTTCGGC	GGGGCCGGTT	CGGCGGGGCC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GGTTCGGCGG	GCCACGCGGG	CCAGCGAGCC	AGCGGGCGGG	GTAGCGGGAC	AGACCGGGCG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCCCGGGTGT	CTCGGGTGGC	GCGTGCCCTA	GGTGGAGAGG	TGACCTCTTT	CCCAACCCGG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GGCGGGGTCA	TGGTACGGGC	CGCGAGCCAC	CACGGCCAC	TCCAGCGCCC	ACCGGGCGCT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GCCGATGGCG	TGCGAGTCCA	TGACGCCCGG	CAGCGGCAGC	CCCTCCCGTT	CCGACTCCAG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GTACGCCACG	TCCAGGCAGT	AGTGCAGGTC	GAGCAGGGCG	CCGCGTCCGC	GGGTGCTGG
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GGGGCGACGA	CGAGCGGGCC	CGGCCATCCG	TCGAAGGTCT	CCCGCGCGAC	GATGTTCCGC
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGTTGCCCA	CCAGTCTCTC	GTCGACCGGC	AGGGACGGGT	CGAGCTGCTT	GGTCAGGGCG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
AGCACCCAGG	TCAGTGCCAA	GAGGGCGTCC	TGGTGCAGCA	CGAACGAACG	GTGCTCCGCC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TTGCCGGCGG	TGATGAAGTC	CCACTCGGGC	GGGTGACCGC	AGTCCACCAG	CCGCGAGCGC
1930	1940	1950			
AGCAGCCAGC	CCATCGCCGC	CTCGGTCCGC	ATGC		

第 4 図

10	20	30	40	50	60
ATGATCGCCG	CCAGGGAGGA	GTTTCTGGCC	GCCGGGCACT	ACGACCCGTT	CTCGGCGGCA
70	80	90	100	110	120
CTCGCCACCG	CGGCCGCGCG	GGCGGTGCCA	CGTCTGTGCC	GGCCCGGGCA	CGGCGTGGGC
130	140	150	160	170	180
GAACCGGTGG	CGTACCCGGA	TCTGGTGGTG	GACGCCGAGG	CCGOTACCGG	CGGCACTC
190	200	210	220	230	240
GCCCGAGTGC	TCGACGCGGT	GCCGACCGCC	GTCGGGCTGG	CGCTGGACGT	CTCGAAGCCC
250	260	270	280	290	300
GCACTACGCC	GGGCGGGCCG	GGCGCATCCC	CGGGCCGGCG	CGGCGGTCTG	CGACACCTGG
310	320	330	340	350	360
GGCGGTTTGC	CGCTGGGCGA	TGCCACGGTC	GCAGTACTGG	TCAAGCTCTT	CGCCCCGCGC
370	380	390	400	410	420
AACGGGCGCG	AATTCCGTCG	GGTGTCTCCG	CCGGACGGCG	CCCTGCTGCT	GGTGACACCG
430	440	450	460	470	480
ACCGCGGAAC	ACCTGGTCCA	GCTGGTGAC	CGGCTGGGGC	TGCTGCGGGT	CGACCCGGCC
490	500	510	520	530	540
AAGGACGCCC	GGGTGGCCGA	CAGCCTCAGC	AGACACTTCG	AACCGGCGCG	GCAGAGACCC
550	560	570	580	590	600
CACCGGCACC	GGCTTCAGCT	GACCCGGAAG	GAGGTGCTGA	CCCTGGTTGG	TATGGGGCGG
610	620	630	640	650	660
AGCGGCTGGC	ACACCGACCC	GGCCCGGGTC	ACCGCGGGGG	TCGCAGCCCT	GTCCGAGCGG
670	680	690	700		
GTCACGGTCA	CGGCGGCTGT	CGGCTCGCC	CGTTACCGCC	CGATCT	

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/65  
C 12 R 1:29)  
(C 12 N 1/21  
C 12 R 1:465)  
(C 12 N 15/76  
C 12 R 1:465)